

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Mai 2004 (13.05.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/039978 A2

(51) Internationale Patentklassifikation?: C12N 15/12,
C07K 14/47, 16/18, G01N 33/50, 33/53, A61K 38/17,
A61P 3/04, 3/10, 5/18, 13/12, 17/00, 19/00, 29/00, 37/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/011799

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Oktober 2003 (24.10.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 51 205.1 31. Oktober 2002 (31.10.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): IPF PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE];
Feodor-Lynen-Str. 31, 30625 Hannover (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEDER, Wolfgang
[DE/DE]; IPF Pharmaceuticals GmbH, Feodor-Lynen-Str.
31, 30625 Hannover (DE). WENDLAND, Martin
[DE/DE]; IPF Pharmaceuticals GMBH, Feodor-Lynen-Str.
31, 30625 Hannover (DE). JOHN, Harald [DE/DE];
IPF Pharmaceuticals GMBH, Feodor-Lynen-Str. 31,
30625 Hannover (DE). RICHTER, Rudolf [DE/DE];
IPF Pharmaceuticals GMBH, Feodor-Lynen-Str. 31,
30625 Hannover (DE). MEYER, Markus [DE/DE]; IPF
Pharmaceuticals GMBH, Feodor-Lynen-Str. 31, 30625
Hannover (DE). FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE];
IPF Pharmaceuticals GMBH, Feodor-Lynen-Str. 31,
30625 Hannover (DE).

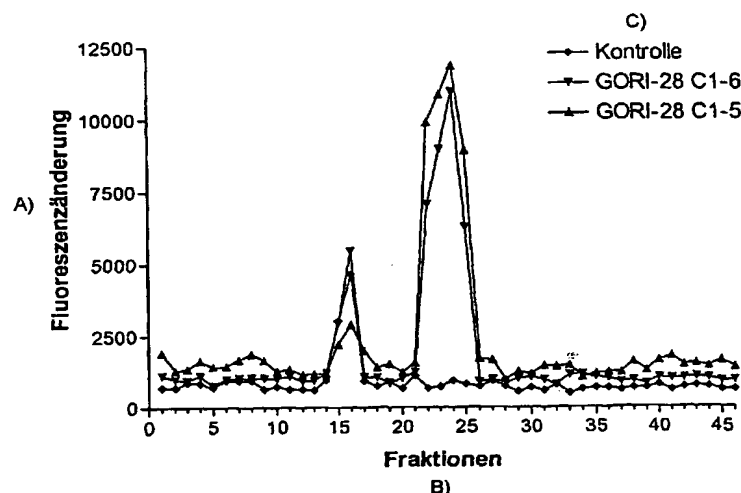
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Patentanwälte,
von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HF-CHONDROOSTEOMODULIN, PRODUCTION, AND USE FOR THE TREATMENT OR DIAGNOSIS OF BONE
DISEASES, CARTILAGE DISEASES, OBESITY, INFLAMMATORY DISEASES, AND SKIN DISEASES

(54) Bezeichnung: HF-CHONDROOSTEOMODULIN, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG ZUR BEHANDLUNG
ODER DIAGNOSE VON KNOCHEN- UND KNORPELERKRANKUNGEN, FETTSUCHT SOWIE INFLAMMATORISCHER
ERKRANKUNGEN UND HAUTERKRANKUNGEN



A) FLUORESCENCE MODIFICATION
B) FRACTIONS
C) CONTROL

BEST AVAILABLE COPY

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/039978 A2



CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Abstract:** The invention relates to the polypeptide COM and the derivatives thereof, methods for the production and isolation thereof from body liquids and tissues in a pure or partially purified form, and the use thereof as a medicament.

(57) **Zusammenfassung:** Gegenstand der Erfindung sind das Polypeptid COM und seine Derivate, Verfahren zur Herstellung und Gewinnung in reiner oder partiell aufgereinigter Form aus Körperflüssigkeiten und Geweben, sowie seine Verwendung als Arzneimittel.

**HF-Chondroosteomodulin, Herstellung und Verwendung zur Behandlung oder
Diagnose von Knochen- und Knorpelerkrankungen, Fettsucht sowie
inflammatorischer Erkrankungen und Hauterkrankungen.**

Die Erfindung betrifft das Polypeptid HF-Chondroosteomodulin (COM) und seine Derivate, sowie Verfahren zur Herstellung und Gewinnung in reiner oder partiell aufgereinigter Form aus Körperflüssigkeiten und Geweben oder durch chemische oder biotechnologische Synthese.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, weitere oder verbesserte Wirkstoffe zur Behandlung oder Diagnose von Knochen- und Knorpelerkrankungen, Fettsucht sowie inflammatorischer Erkrankungen und Hauterkrankungen bereitzustellen.

Figuren:

Figur 1

Spezifische Aktivierung von GORI-28 Zellen (Klon C1-6 und C1-5) durch Fraktionen 22-25 des pH Pools 7. Die Kontrollzellen (control) exprimieren den GORI-28 nicht. Unspezifische Aktivität ist in den Fraktionen 15-16 zu erkennen.

Figur 2

Schritt 3 der chromatographischen Reinigung von COM über eine Bakerbond RP-C18 Säule.

Figur 3

Schritt 7 der chromatographischen Reinigung von COM über eine Poly Hydroxyethyl HILIC Säule.

Figur 4

Dosis-Wirkungs-Korrelation. Aufgetragen ist die Veränderung der Fluoreszenz gegen das eingesetzte Volumen von Fraktion 30 des 8. Aufreinigungsschrittes (siehe Beispiel 4).

Figur 5

Dosis-Wirkungs-Kurve. Aufgetragen ist die Veränderung der Fluoreszenz gegen das eingesetzte Volumen von Fraktion 30 des 8. Aufreinigungsschrittes (siehe Beispiel 4) im halblogarithmischen Maßstab.

Figur 6

Aktivierung von GORI-28 Zellen mit rekombinantem TIG2 aus konditioniertem Medium von überexprimierenden CHO Zellen gereinigt über eine Source RPC15 (10 x 250 mm)

Figur 7

Aktivierung von GORI-28 Zellen mit rekombinanten COM gereinigt aus Zellüberstand von einem überexprimierenden Hefeklon.

Figur 8

Aktivierung von osteogenen Zellen (MG-63) und dendritischen Zellen (DC) mit COM gereinigt aus Hämofiltrat. Als Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle sind GORI-28 exprimierende bzw. nicht-exprimierende CHO-Zellen gezeigt.

Figur 9

Expression von GORI-28 und TIG2 in verschiedenen Zelltypen

Figur 10

Expression von GORI-28 und TIG2 in Hautproben von Patienten mit Hauterkrankungen

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird gelöst durch COM mit der Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 1

```
1  ELTEAQRRGL QVALEEFHKH PPVQWAFQET SVESAVDTPF PAGIFVRLEF
51  KLQQTSCRKR DWKKPECKVR PNGRKRKCLA CIKLGSSEKV LGRLVHCPIE
101 TQVLREAEEH QETQCLRVQR AGEDPHSFYF PGQF
```

sowie seine natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte Derivate oder mit einem Pyroglutamat am N-Terminus.

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate von COM, wobei die Aminosäuresequenz von COM durch Aminosäureaustausche, -insertionen oder -deletionen verändert ist, mit den Massgaben, dass

- die Derivate eine Länge von nicht mehr als 150 Aminosäuren, vorzugsweise 120 bis 150, insbesondere 129 bis 140 Aminosäuren aufweisen,
- die Derivate zu COM zu mehr als 80%, vorzugsweise mehr als 90%, insbesondere mehr als 95% Sequenzidentität aufweisen,
- die Derivate im funktionellen Test mit dem FLIPR-System den Rezeptor GORI-28 aktivieren, so dass eine Rezeptoraktivität gemessen wird, die mindestens 50% der unter gleichen Testbedingungen von COM ausgelösten Rezeptoraktivität beträgt, vorzugsweise jedoch größer ist als diese Aktivität, und besonders bevorzugt diese um mindestens 20% übertrifft.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird außerdem gelöst durch die weiteren Ausführungsformen der Erfindung gemäß den Ansprüchen 3 bis 12.

COM besitzt die Fähigkeit, Knochenzellen (Osteoblasten und Osteoklasten) und Knorpelzellen, sowie Fett- Immun- und Hautzellen in ihrer Funktion zu beeinflussen. Der Stoff kann aus der Körperflüssigkeit menschliches Blutfiltrat (Hämofiltrat, HF) gewonnen werden. Der Stoff ist als COM bezeichnet und kann zum Zwecke der medizinischen und gewerblichen Verwendung als Medikament zur Behandlung oder Diagnose von Knochen- und Knorpelerkrankungen, sowie Fettsucht, Diabetis Typ 2, Krebserkrankungen, Tumor Metastasen, inflammatorischen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, vererbten oder erworbenen Immundefizienzen, Gewebeabstoßung, Hauterkrankungen wie Psoriasis, Ekzeme, Akne oder trophischen Hauterkrankungen, inflammatorischen Infektionen, viralen, bakteriellen oder parasitischen Infektionen, weiblicher Infertilität, Ovar- und Uterustumoren benutzt werden.

Zur Analyse von Stoffen aus Peptidbanken wurde ein Bioassay entwickelt, der an transfizierten CHO-Zellen eine Aktivierung der Signaltransduktion zeigt. Überraschenderweise wurden im Blutfiltrat aktivierende Substanzen gefunden, die in Zellkulturen von GORI-28-Rezeptoren transfizierter Zellen, auch bekannt als ChemR23 (Genbank Accession No. Y14838) oder DEZ (Genbank Accession No. U79527), die intrazelluläre Ca^{++} -Aktivierung beeinflussen. Dieser Rezeptor ist funktionell auf

osteogenen Zellen, Adipozyten, Hautzellen sowie auf Immunzellen aktiv. Die Beeinflussung wurde u.a. gemessen aufgrund der Stimulierung von intrazellulärer Ca^{++} -Aktivierung von Zellen, die auf der Membranoberfläche den GORI-28-Rezeptor tragen. Mit Hilfe dieses Testes konnte aus HF-Peptidbank (menschliches Blutfiltrat) überraschenderweise eine Substanz identifiziert werden, die charakteristische Elutionsprofile in den Chromatographieaufreinigungen zeigt. Die Substanz wurde isoliert und durch massenspektrometrische, einschlägige Analysen als molekulare Einheit identifiziert. Es handelt sich um eine zirkulierende Form des bereits aus Klonierung gefundenen TIG2 (Tazarotene-induced responder protein 2; Nagpal S. et al. (1997) J. Invest. Dermatol., 109: 91-95) (Genbank Accession No. U77594).

Die cDNA für den GORI-28 wurde über PCR aus genomischer DNA kloniert und in einen eukaryotischen Expressionsvektor subkloniert. Es wurden stabil transfizierte CHO-Zelllinien erzeugt, die den GORI-28 überexprimieren und anschließend in einem funktionellen Screening Assay eingesetzt. Dabei wurden GORI-28 exprimierende Zellen mit Fraktionen aus HF stimuliert und die Rezeptoraktivierung über die transiente Erhöhung des Second Messenger Ca^{2+} verfolgt. Liganden sind bisher für den Rezeptor GORI-28 nicht beschrieben worden und der Rezeptor ist deshalb als Orphan Rezeptor klassifiziert worden.

Der GORI-28 Rezeptor wird auf sich entwickelnden Knochen- und Knorpelzellen, sowie auf dendritischen Zellen, in Lymphknoten, Milz, Plazenta, Uterus, Lunge, Aorta und in der adulten Nebenschilddrüse exprimiert (Samson et al., 1998, Eur. J. Immunol. 28:1689-1700, Methner et al., 1997, Biochem Biophys Res Commun 233:336-342).

TIG2 wird im Pankreas, Leber, Adipocyten, Nebenniere, Lunge, Ovar, Uterus, Hypophyse, Epidermiszellen und Osteoklasten unterstützenden Stromazellen exprimiert (Nagpal S. et al., 1997, Adams et al., 1999, J. Cell. Biochem. 74:587-595). Zudem wurde beobachtet, dass TIG2 im geschädigten Gewebe von Psoriasis-Patienten im Vergleich zu nicht geschädigtem Gewebe in verminderter Menge exprimiert wird. Nach Behandlung von geschädigtem Gewebe mit Tazaroten wird die TIG2 Expression induziert (Nagpal S. et al., 1997).

Aus diesen und in den Beispielen aufgeführten Daten leiten sich physiologische Bedeutung von COM und GORI-28 bei der Knochenentwicklung, des Energiestoffwechsels, der Physiologie und Erhaltung der Haut und von inflammatorischen Prozessen ab.

COM wird als körpereigenes zirkulierendes Peptid für eine Anwendung als Arzneimittel besser geeignet sein, als andere Derivate des TIG2 Gens, da es vom menschlichen Immunsystem nicht als Fremdschubstanz erkannt wird, und vorteilhafterweise nicht mit einer Autoimmunantwort zu rechnen ist. Zudem lässt die spezifische Prozessierung sowohl am N- wie am C-Terminus erwarten, dass dies zur Ausbildung der biologischen Funktion erforderlich ist und zu einer höheren Aktivität führt.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit einen neuen osteochondroaktiven Faktor, COM, mit den folgenden molekularen Eigenschaften:

- (1) Molekulargewicht des Precursors (aus Gendaten): 18617 Da
- (2) Molekulargewicht des gefundenen Proteins COM: 15566 Da
- (3) Chromatographisches Verhalten: siehe Beispiel 5
- (4) Aminosäuresequenz: gemäß Anspruch 1
- (5) pI-Wert: 8.60

Beispiele

Beispiel 1: Klonierung des GORI-28/ChemR23 Rezeptors

Der GORI-28 wurde von Samson et al. (1998) als ChemR23 und von Methner et al. (1997) als DEZ beschrieben, wobei mehrere Datenbankeinträge existieren. Die Analyse eines genomischen Klon (Genbank Accession No. NT_009660.4) zeigte, dass die beschriebenen Varianten von DEZ Isoform A (Genbank Accession No. U79526) und Isoform B (Genbank Accession No. U79527) die Produkte von alternativem Splicing darstellen. DEZ Isoform A ist identisch in der Aminosäuresequenz zu ChemR23 und DEZ Isoform B, wobei der N-Terminus von Isoform A um zwei Aminosäuren, Methionin und Arginin, verlängert ist.

Um eine erleichterte Klonierung aus genomischer DNA zu ermöglichen wurde *in silico* ein genomischer Klon für ChemR23/DEZ Isoform B erzeugt, der die Bezeichnung GORI-28 erhielt. Der GORI-28 enthält gegenüber der Sequenz von ChemR23 (Genbank Accession No. Y14838) in der Position 900 ein Guanin, was eine stille Mutation darstellt, und ab Position 1294 eine von der publizierten Sequenz völlig abweichende Sequenz. Die cDNA für GORI-28 wurde mit den Primer 5' TGG TCC CTG TCT TCT CTT GC 3' (GORI28oli1) und 5' TGT CCC TGG GTT GAG AGA GT 3' (GORI28oli2) über PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Dabei wurde ein 1186 bp Fragment erhalten, das anschließend in den Expressionsvektor pCI oder andere übliche Expressionsvektoren subkloniert wurde. Die Sequenz wurde über DNA-Sequenzanalyse überprüft und bestätigt.

Die GORI-28 cDNA weist folgende Polynukleotidsequenz SEQ ID Nr. 2 auf:

```

1  TGGTCCCTGT CTTCTCTTGC AGAGAATGGA GGATGAAGAT TACAACACTT
51  CCATCAGTTA CGGTGATGAA TACCCTGATT ATTTAGACTC CATTGTGGTT
101 TTGGAGGACT TATCCCCCTT GGAAGCCAGG GTGACCAGGA TCTTCCTGGT
151 GGTGGTCTAC AGCATCGTCT GCTTCCTCGG GATTCTGGGC AATGGTCTGG
201 TGATCATCAT TGCCACCTTC AAGATGAAGA AGACAGTGAA CATGGTCTGG
251 TTCCTCAACC TGGCAGTGGC AGATTTCTTG TTCAACGTCT TCCTCCCAAT
301 CCATATCACC TATGCCGCCA TGGACTACCA CTGGGTTTTT GGGACAGCCA
351 TGTGCAAGAT CAGCAACTTC CTTCTCATCC ACAACATGTT CACCAGCGTC
401 TTCCTGCTGA CCATCATCAG CTCTGACCGC TGCATCTCTG TGCTCCTCCC
451 TGTCTGGTCC CAGAACCACC GCAGCGTTTCG CCTGGCTTAC ATGGCCTGCA
501 TGGTCATCTG GGTCCTGGCT TTCTTCTTGA GTTCCCCATC TCTCGTCTTC
551 CGGGACACAG CCAACCTGCA TGGGAAAATA TCCTGCTTCA ACAACTTCAG
601 CCTGTCCACA CCTGGGTCTT CCTCGTGGCC CACTACTTCC CAAATGGACC
651 CTGTGGGGTA TAGCCGGCAC ATGGTGGTGA CTGTCACCCG CTTCTCTGT
701 GGCTTCCTGG TCCCAGTCCT CATCATCACA GCTTGCTACC TCACCATCGT
751 TTGCAAACTG CAGCGCAACC GCCTGGCCAA GACCAAGAAG CCCTTCAAGA
801 TTATTGTGAC CATCATCATT ACCTTCTTCC TCTGCTGGTG CCCCTACCAC
851 AACTCAACC TCCTAGAGCT CCACCACACT GCCATGCCTG GCTCTGTCTT
901 CAGCCTGGGT TTGCCCTGG CCCTGCCCCT TGCCATTGCC AACAGCTGCA
951 TGAACCCCAT TCTGTATGTT TTCATGGGTC AGGACTTCAA GAAGTTCAAG
1001 GTGGCCCTCT TCTCTCGCCT GGTCAATGCT CTAAGTGAAG ATACAGGCCA
1051 CTCTTCCTAC CCCAGCCATA GAAGCTTTAC CAAGATGTCA TCAATGAATG
1101 AGAGGACTTC TATGAATGAG AGGGAGACCG GCATGCTTTG ATCCTCACTG
1151 TGGAACCCCT CAATGGACTC TCTCAACCCA GGGACA

```

Beispiel 2: Erzeugung von GORI-28 überexprimierenden CHO Zellen

Der Expressionsvektor mit der cDNA für GORI-28 wurde mit dem Transfektionsreagenz

Effectene oder anderen üblichen Transfektionsreagenzien nach Angaben der Hersteller in CHO Zellen transfiziert, die endogen das G-Protein $\alpha 16$ exprimieren. Stabil transfizierte Zellklone wurden in Gegenwart von Neomycin (G-418) selektioniert und die erhaltenen Zellklone über Northern Blot Analyse auf Expression des GORI-28 untersucht. Zellklone mit unterschiedlich starker Expression (GORI-28 C1-5, C1-6, C1-8) wurden für das Screening mit Peptidfraktionen ausgewählt (s. Beispiel 3)

Beispiel 3: Funktioneller Test für GORI-28

Mit Hilfe des FLIPR-Systems (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices) können Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration detektiert werden. Nach Rezeptorstimulation wird der intrazelluläre Botenstoff IP3 freigesetzt, der IP3-spezifische Kanäle des endoplasmatischen Retikulums öffnet und den Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen ins Cytosol bewirkt. Vor der Messung werden die Zellen mit dem Kalzium-sensitiven Farbstoff Fluo-4 (Molecular Probes) beladen. Ca^{2+} -Ionen binden an Fluo-4 und nach Anregung des Fluo-4- Ca^{2+} Komplexes durch einen Argonlaser (488 nm) wird die Emission bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Dieses Lichtsignal wird von einer CCD-Kamera detektiert und aufgezeichnet und anschließend mit einem Computerprogramm ausgewertet. Zellen werden in 96-Lochplatten mit 20.000 Zellen/Loch ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag werden die Zellen für 40 min in Hepes/HBSS Puffer, pH7.4, 2.5 mM Probenecid mit 2 μM Fluo-4 AM beladen, anschließend gewaschen und mit 100 μl Hepes/HBSS, pH7.4, 2.5 mM Probenecid für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl Hämofiltratfraktion oder anderer Testsubstrate werden die Veränderungen der intrazellulären Fluoreszenz online aufgezeichnet.

Beispiel 4: Isolierung von HF-Chondroosteomodulin

Die Isolierung von COM aus 8.000 Liter menschlichem Blutfiltrat wurde nach folgendem Beispiel vorgenommen:

Isolierung von HF-Chondroosteomodulin aus Hämofiltrat: Reinigungsstrategie**Kollektion von 8.000 L-Batch menschlichen Hämofiltrats**

Kationen-Austauscher-Chromatographie (Stufenelution)	1. Schritt
RP-Fineline Source C15-Chromatographie (Gradientenelution)	2. Schritt
Bakerbond RP C18-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	3. Schritt
RP-Biotek C4-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	4. Schritt
RP-Vydac C18-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	5. Schritt
RP-Phenomenex C5-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	6. Schritt
Poly Hydroxyethyl HILIC-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	7. Schritt
RP-Phenomenex C5-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	8. Schritt

Hohe Reinheit erreicht

8000 Liter Hämofiltrat wurden über eine Membran mit einer Ausschlußgröße von 50 kD ultrafiltriert, anschließend an eine Kationen-Austauscher-Säule (Fractogel SP 650 (M)) gebunden und danach stufenweise mit 7 Puffern mit aufsteigendem pH-Wert eluiert (pH Pool 1-7, 7 Eluate). In einem zweiten Schritt wurde jedes Eluat über eine Fineline Source RP-C (C15, 10 x 15.5 cm, 300 Å) chromatographiert, so dass für jeden pH Pool etwa 46 Fraktionen erhalten wurden. Für den Biotest wurden lyophilisierte Aliquots in Hepes/HBSS Puffer rekonstituiert und wie in Beispiel 3 beschrieben verwendet. Dabei zeigten Fraktionen 22-25 des pH Pools 7 eine spezifische Aktivität auf GORI-28 Zellen, nicht aber auf einer Kontrollzelllinie, die den Rezeptor nicht exprimiert (s. Fig. 1). Etwa 700 mg lyophilisierte Mutterfraktionen der GORI-28-aktivierenden Fraktionen wurden vereinigt und in sechs weiteren Schritten (s. Schema) aufgereinigt. Das zur hohen Reinheit aufgetrennte COM zeigt die chromatographischen, massenspektrometrischen und molekularen Eigenschaften wie in Beispiel 5 gezeigt.

Beispiel 5: Chromatographische, massenspektrometrische und molekularen Eigenschaften

Aus der chromatographischen Aufreinigung von COM sind beispielhaft die Schritte 3 und 7 in Fig. 1 und Fig. 2 dargestellt, wobei die Fraktionen, in denen die biologische Aktivität gefunden wurde, markiert sind.

In Fig. 4 ist eine Dosis-Wirkungs-Korrelation von COM dargestellt. Aufgetragen ist die Veränderung der Fluoreszenz gegen das eingesetzte Volumen von Fraktion 30 des 8. Aufreinigungsschrittes (siehe Beispiel 4).

In Fig. 5 ist eine Dosis-Wirkungs-Kurve von COM dargestellt. Aufgetragen ist die Veränderung der Fluoreszenz gegen das eingesetzte Volumen von Fraktion 30 des 8. Aufreinigungsschrittes (siehe Beispiel 4).

Die Reinheit von COM wurde über Kapillarzonenoelektrophorese (P/ACE 2000, Beckman) überprüft (nicht dargestellt). Die Bestimmung der molekularen Masse erfolgte über ein Voyager DE PRO Massenspektrometer (PerSpective), wobei eine Masse von 15562 Da ermittelt wurde. Der N-Terminus und die ersten 33 Aminosäuren wurden über Edman Abbau bestimmt (Applied Biosystems Gasphasen-Sequencer 473 A). Aus diesen Daten leiten sich die Aminosäuresequenz von COM mit 134 Aminosäuren und ein theoretisches Molekulargewicht von 15566 Da ab, dabei wird berücksichtigt, dass die sechs Cysteinreste drei Disulfidbrücken ausbilden. Die bestimmte Aminosäuresequenz von COM lautet:

```
1  ELTEAQRRL QVALEEFHKK PPVQWAFQET SVESAVDTPF PAGIFVRLEF
51  KLQQTSCRKR DWKKPECKVR PNGRKRKCLA CIKLGSEDKV LGRLVHCPIE
101 TQVLREAEEH QETQCLRVQR AGEDPHSFYF PGQF
```

Beispiel 6: Klonierung und rekombinante Expression von TIG2 in CHO Zellen

Die cDNA für humanes TIG2 (Genbank Accession No. U77594) wurde aus Leber cDNA über PCR mit den Primern 5' GCCAGGGTGACACGGAAG 3' (TIG2oli1) und 5' GAGGCACCACGCAGCTC 3' (TIG2oli2) amplifiziert. Dabei wurde ein Fragment von 537 bp erhalten, das in den Vektor pGEM5Zf-T oder andere übliche Vektoren subkloniert wurde. Die Sequenz wurde über DNA-Sequenzanalyse überprüft und bestätigt. Aus diesem rekombinanten Vektor wurde ein Fragment, welches die cDNA von TIG2 enthält, mittels geeigneter Restriktionsenzyme ausgeschnitten, und in den Expressionsvektor pCI oder andere übliche Expressionsvektoren subkloniert. CHO Zellen wurden mit dem rekombinanten Expressionsvektor wie unter Beispiel 2 transfiziert und stabile Zellklone wie unter Beispiel 2 selektioniert. Die erhaltenen Zellklone wurden auf Expression von TIG2 über RT-PCR untersucht.

Beispiel 7: Aktivierung von GORI-28 mit rekombinantem TIG2

Ein TIG2-exprimierender Zellklon wurde für die Produktion von TIG2 expandiert. Vier konfluente 75 cm Flaschen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschliessend Medium ohne FKS appliziert. Nach 72 h Inkubation wurde das konditionierte Medium abgenommen, 5 min mit 500 g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen, und anschliessend über eine Source RPC15 (10 x 250 mm) aufgereinigt. Die erhaltenen Fraktionen wurden im FLIPR Assay (s. Beispiel 3) auf GORI-28-stimulierende Aktivität getestet. In den Fraktionen 52 und 53 wurde Aktivität gefunden, die GORI-28 Zellen nicht aber eine Kontrollzelllinie stimulieren (s. Fig. 6). Zur Kontrolle wurde konditioniertes Medium von CHO Zellen verwendet, die ein anderes Peptid exprimieren. In diesem konditionierten Medium wurde keine GORI-28 stimulierende Aktivität gefunden (nicht dargestellt).

Beispiel 8: Klonierung und rekombinante Expression von COM in Hefe

Über PCR mit den Primern 5' CTCTCGAGAAAAGAGAGCTCACGGAAGCCCAGC 3' (COMoli1) und 5' TTGTCGACTTAGAACTGTCCAGGGAAGTAGAAGC 3' (COMoli2) wurde unter Verwendung der in Beispiel 6 klonierten TIG2 cDNA ein 427 bp Fragment amplifiziert, welches die cDNA für COM darstellt, und anschließend in den Vektor pGEM5Zf-T oder andere übliche Vektoren subkloniert. Nach Bestätigung der Sequenz über DNA-Sequenzanalyse wurde aus dem rekombinanten Vektor mittels geeigneter Restriktionsenzyme ein Fragment ausgeschnitten und in den modifizierten Hefe-Expressionsvektor YEpFLAG-1 oder andere übliche Expressionsvektoren subkloniert. Über Elektroporation wurde das Expressionskonstrukt in den Hefestamm BJ3505 oder andere übliche Hefestämme transformiert. Die dabei entstehenden ADH2+-Klone wurden über PCR-Analyse auf Insertion der COM-DNA ins Hefegenom überprüft. Zur Herstellung von rekombinanten COM wurden 10 ml Kulturen mit COM-positiven Klonen angeimpft und die Expression induziert. Nach 96 h wurden die Zellüberstände geerntet und auf die Expression des rekombinanten COM nach Auftrennung über ein Gel (SDS-PAGE) und Anfärbung mit Coomassieblau überprüft. In dem beschriebenen Hefeexpressionssystem wird die cDNA von COM an das N-terminale Signal des Hefe Alpha-Faktors fusioniert.

Die Alpha-Faktor Signalsequenz bewirkt, dass das Fusionsprodukt ins Zellmedium sezerniert wird. Die Alpha-Faktor Signalsequenz wird durch die endogene Protease Kex 2 abgespalten und dabei entsteht reifes COM.

Beispiel 9: Aufreinigung von rekombinantem COM und Nachweis der Aktivität

Von einem COM-exprimierenden Hefeklon wurde aus dem Zellüberstand rekombinantes COM aufgereinigt. Der Zellüberstand wurde filtriert (0,2 µM Filter), mit Puffer A (10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) 1/3 verdünnt, auf eine Heparinsäule (Hightrap) aufgetragen und mit Puffer B (Puffer A mit 1.5 M NaCl) eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden im FLIPR Assay (s. Beispiel 3) zur Lokalisierung der GORI-28-stimulierenden Aktivität getestet. Im zweiten Aufreinigungsschritt wurden die aktiven Fraktionen vereinigt, auf eine RPC15 Säule aufgetragen und eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden wie zuvor über den funktionellen Assay bestimmt, vereinigt und im dritten Aufreinigungsschritt über eine Phenomenex C18 Säule aufgereinigt. Aufgereinigtes rekombinantes COM zeigt spezifische Aktivität auf GORI-28 Zellen, nicht aber auf einer Kontrollzelllinie, die den Rezeptor nicht exprimiert (s. Fig. 7).

Beispiel 10 Aktivierung von osteogenen Zellen durch COM

Zur Untersuchung der funktionellen Aktivierung von Knochenzellen durch COM wurden MG-63 Zellen, eine etablierte humane osteosarkoma Zelllinie (Osteoblast-ähnlicher Typ), wie in Beispiel 3 beschrieben am Vortag mit 20.000 Zellen pro Loch in 96-Lochplatten ausgesät und im FLIPR-Assay getestet. Die Zellen wurden mit aus HF-gereinigtem COM (siehe Beispiel 4 und 5) stimuliert und zeigten eine COM-induzierte Freisetzung von Ca²⁺-Ionen (s. Fig. 8). Als Positiv- bzw. Negativkontrolle sind die GORI-28 überexprimierende CHO-Zelllinie und eine CHO-Zelllinie, die einen anderen G-Protein gekoppelten Rezeptor exprimiert, gezeigt.

Beispiel 11: Aktivierung von dendritischen Zellen durch COM

Dendritische Zellen wurden aus humanem Vollblut gewonnen. Zunächst wurden aus Vollblut (500 ml) über mehrere Zentrifugationsschritte und Separation mit Hilfe von

paramagnetischen Antikörpern (Anti-CD14) monocytäre Zellen isoliert (CD14+). Die erhaltenen Vorläuferzellen wurden mit GM-CSF (800 U/ml) und Interleukin-4 (500 U/ml) behandelt, um die Differenzierung zu dendritischen Zellen zu induzieren (Inkubationszeit 7 Tage). Anschließend wurden die Zellen mit LPS stimuliert, um sogenannte reife dendritische Zellen zu erhalten. Diese reifen dendritischen Zellen wurden am Vortag in 96-Lochplatten mit einer Zelldichte von 20,000 Zellen/Loch ausgesät und anschließend, wie im Beispiel 3 beschrieben, im FLIPR-Assay getestet. Die Zellen wurden mit aus HF-gereinigtem COM (siehe Beispiel 4 und 5) stimuliert und zeigten eine COM-induzierte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen (s. Fig. 8).

Beispiel 12: Expression von TIG2 und GORI-28 in ausgewählten Zelllinien

Die native Expression von TIG2 und GORI-28 in verschiedenen Zelllinien wurde über RT-PCR mit genspezifischen Primern untersucht. COM wurde mit dem Primerpaar TIG2oli1 und TIG2oli2 (s. Beispiel 6) als 537bp cDNA Fragment amplifiziert und gelelektrophoretisch dargestellt. In Analogie wurde der GORI-28 wurde mit Hilfe des Primerpaars 5' GGC CAT GTG CAA GAT CAG CAA CT 3' (mDEZoli1) und 5' AGA ATG GGG TTC ATG CAG CTG TT 3' (mDEZoli2) als 618 bp Fragment amplifiziert bzw. nachgewiesen; für die PCR Amplifikation aus murinen Adipozyten wurde das Primerpaar 5' TCT ACA ACG GTG GAA CAG TGA 3' (mDEZoli3) und 5' AAG AAA GCC AGG ACC CAG A 3' (mDEZoli4) eingesetzt, dabei entsteht ein 536 bp Fragment; für die Amplifikation aus humanen dendritischen Zellen wurde das Primerpaar 5' CAG ACA ACA TAA CGG TGA ATG A 3' (hDEZ_a_Oli5) und 5' AAG AAA GCC AGG ACC CAG A 3' (hDEZ_a_Oli4) eingesetzt, dabei entsteht ein 524 bp Fragment. Von den zu untersuchenden Zellen wurden aus Zellproben nach üblichen Methoden RNA isoliert, die dann in eine Erststrang cDNA umgeschrieben wurde und für die PCR-Amplifikation eingesetzt wurde.

Die Expression des Liganden COM konnte in reifen humanen dendritischen Zellen (DC) sowie Vorläuferzellen (pDC), murinen Osteosarkomzellen MC3T3 (Osteoblast-ähnlicher Typ, MC), reifen murinen Adipozyten (Fettzellen, Ad) sowie Vorläuferadipozyten (pAd), humanen Keratinozyten (HaCaT, Ha), humanen Osteosarkomzellen MG-63 (Osteoblast-ähnlicher Typ, MG) und in humanen Hepatozyten HepG2 (He) detektiert werden (s. Fig. 9 A).

Die Expression des COM-Rezeptors GORI-28 wurde in Jurkat T-Zellen (humane leukämische T-Zelllinie, Ju), verstärkt in PMA/Ionomycin aktivierten Jurkat T-Zellen (Ju P), in HaCaT-Zellen (Ha), MG-63 Zellen (MG), MC3T3 (MC), dendritischen (DC) sowie Vorläuferzellen (pDC), in reifen Adipozyten (Ad) nicht aber in Vorläuferzellen (pAd) nachgewiesen (s. Fig. 9 B). In Fig. 9 B ist eine Negativkontrolle (co) gezeigt, in der die cDNA als Template gegen eine Wasserprobe ersetzt wurde.

Die Expressionsanalyse des COM Rezeptors GORI-28 zeigt, dass seine Expression durch physiologische Prozesse gesteuert wird. Im dargestellten Beispiel konnte die Expression des Rezeptors durch in vitro T-Zell Aktivierung erhöht und in unreifen Adipozyten durch Differenzierung induziert werden. Die T-Zell Aktivierung wurde in Jurkat T-Zellen mittels Phorbol ester und Ionomycin erzielt. Die Differenzierung der unreifen Adipozyten wurde durch Dexamethason, 8BrcAMP und Insulin induziert.

Beispiel 13: Expression von COM und GORI-28 in Hautzellen von Patienten mit Hauterkrankungen

Wie in Beispiel 12 beschrieben wurde die Expression von COM und seinem Rezeptor GORI-28 über RT-PCR ermittelt. Für die Amplifikation des GORI-28 wurde in diesem Fall das Primerpaar 5' GCA CAG CAT CAC TTC TAC CAC TT 3' (hDEZoli3) und 5' CTG TAG ACC ACC ACC AGG AAG A 3' (hDEZoli2) verwendet, dabei entsteht ein 324 bp Fragment. Hautstanzen von Patienten ohne Hauterkrankung (Kontrolle, C) und von Patienten die unter Psoriasis (Pso) oder atopischer Dermatitis (AD) leiden wurden über eine Hautklinik bezogen. Das Material wurde nach üblichen Methoden aufbereitet, um RNA zu isolieren, von der wiederum wie in Beispiel 12 beschrieben eine Erststrang cDNA synthetisiert wurde, die für die PCR-Amplifikation eingesetzt wurde. Der Rezeptor GORI-28 wird sowohl im Hautgewebe von Gesunden wie auch im Hautgewebe von Patienten mit Psoriasis oder atopischer Dermatitis exprimiert (s. Fig. 10 A). Im Gegensatz dazu konnte COM-Expression nur im Gewebe von Gesunden, nicht aber im Hautgewebe von Patienten die unter Psoriasis oder atopischer Dermatitis leiden nachgewiesen werden (s. Fig. 10 B). Damit steht die fehlende Expression von COM im kausalen Zusammenhang von Hauterkrankungen und weist auf eine therapeutische Wirksamkeit von COM für dieses Indikationsgebiet hin.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass im menschlichen Blutfiltrat die zirkulierende Substanz COM vorkommt, die isoliert und charakterisiert werden konnte. Sie übt ein osteochondroanabole, immunmodulatorische, sowie Haut- und Energiestoffwechsel- regulierende Wirkungen aus.

Patentansprüche

1. COM mit der Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 1:

```
1  ELTEAQRRGL QVALEEFHKH PPVQWAFQET SVESAVDTPF PAGIFVRLEF
51  KLQQTSCRKR DWKKPECKVR PNGRKRKCLA CIKLGSEDKV LGRLVHCPIE
101 TQVLREAE EH QETQCLRVQR AGEDPHSFYF PGQF
```

sowie seine natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte Derivate oder mit einem Pyroglutamat am N-Terminus.

2. Derivate des COM nach Anspruch 1, wobei die Aminosäuresequenz des COM durch Aminosäureaustausche, -insertionen oder -deletionen verändert ist, mit den Massgaben, dass

- die Derivate eine Länge von nicht mehr als 150 Aminosäuren aufweisen,
- die Derivate zu COM zu mehr als 80% Sequenzidentität aufweisen,
- die Derivate im funktionellen Test mit dem FLIPR-System den Rezeptor GORI-28 aktivieren, so dass eine Rezeptoraktivität gemessen wird, die mindestens 80% der unter gleichen Testbedingungen von COM ausgelösten Rezeptoraktivität beträgt, vorzugsweise jedoch über der durch COM ausgelösten Rezeptoraktivität liegt.

3. COM oder ein Derivat nach Anspruch 1 oder 2 und dessen Rezeptor GORI-28 als Ligand-Rezeptor-System.

4. Verwendung eines Ligand-Rezeptorsystems nach Anspruch 3 zum Screening von Substanzen aus Peptidbibliotheken oder anderer Stoffbanken und als Drug Target.

5. Verfahren zur Herstellung von COM oder seiner Derivate nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es über Zellkulturen hergestellt und chromatographisch gereinigt wird, oder daß es aus menschlichem Blut über übliche Chromatographie-Verfahren in bekannter Weise isoliert wird, oder dass es durch die üblichen Verfahren der chemischen oder biotechnologischen Synthese hergestellt und mit den gängigen Chromatographie-Verfahren gereinigt wird.

6. Arzneimittel enthaltend COM oder seine Derivate nach Anspruch 1 oder 2, gegebenenfalls neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen.
7. Arzneimittel nach Anspruch 6, insbesondere als Lyophilisat, wobei die galenische Applikationsform mit Mannit aufgenommene Form in sterilen Ampullen zur Auflösung in physiologischer Kochsalzlösung und/oder Infusionslösungen zur wiederholten Einzelinjektion und/oder Dauerinfusion in Mengen von 300 Mikrogramm bis 30 Milligramm reines COM pro Therapie-Einheit enthält.
8. Verwendung von COM sowie seiner Derivate nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen der Nebenschilddrüse, insbesondere bei deren Unterfunktion (Hypoparathyreodismus),
zur Behandlung von degenerativen Knochenerkrankungen, insbesondere der Osteoporose,
zur Behandlung von Knochenfrakturen in der Heilungsphase,
zur Behandlung von Knorpelerkrankungen, Bindegewebserkrankungen, Rheuma und Arthrose,
zur Behandlung von Fettsucht und Diabetis Typ 2,
zur Behandlung von Erkrankungen des Immunsystems,
zur Behandlung von Erkrankungen, die mit der Migrationsbeeinflussung von Stammzellen therapiert werden, u.a. die Chemotherapie,
zur Behandlung von Nierenerkrankungen, die mit Störungen der Elektrolytausscheidung einhergehen, insbesondere bei der akuten Niereninsuffizienz sowie Phosphat- und Calciumausscheidungsstörungen,
oder zur Behandlung von Hauterkrankungen, insbesondere Psoriasis, Ekzemen und Akne.
9. Verwendung von COM sowie seiner Derivate nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Diagnostikmittels zur Diagnose von Erkrankungen, insbesondere nach Anspruch 7, wobei spezifische Antikörper gegen das synthetische Molekül hergestellt werden und die Blutkonzentration von COM über Immuntests oder über quantitative Massenspektrometrie gemessen wird.

10. Verwendung von COM sowie seiner Derivate zur Herstellung eines Arzneimittels nach Anspruch 8 in verschiedenen galenischen Applikationsformen, insbesondere als Lyophilisat.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die galenische Applikationsform, insbesondere die lyophilisierte, mit Mannit aufgenommene Form in sterilen Ampullen zur Auflösung in physiologischer Kochsalzlösung und/oder Infusionslösungen zur wiederholten Einzelinjektion und/oder Dauerinfusion in Mengen von 300 Mikrogramm bis 30 Milligramm reines COM pro Therapie-Einheit enthält.

13. Primer mit einer der Nucleotidsequenzen:

TGG TCC CTG TCT TCT CTT GC	(GORI28oli1) ; SEQ ID Nr. 3
TGT CCC TGG GTT GAG AGA GT	(GORI28oli2) ; SEQ ID Nr. 4
GGC CAT GTG CAA GAT CAG CAA CT	(mDEZoli1) ; SEQ ID Nr. 5
AGA ATG GGG TTC ATG CAG CTG TT	(mDEZoli2) ; SEQ ID Nr. 6
TCT ACA ACG GTG GAA CAG TGA	(mDEZoli3) ; SEQ ID Nr. 7
AAG AAA GCC AGG ACC CAG A	(mDEZoli4) ; SEQ ID Nr. 8
CAG ACA ACA TAA CGG TGA ATG A	(hDEZ_a_Oli5) ; SEQ ID Nr. 9
AAG AAA GCC AGG ACC CAG A	(hDEZ_a_Oli4) ; SEQ ID Nr.
10	
GCA CAG CAT CAC TTC TAC CAC TT	(hDEZoli3) ; SEQ ID Nr. 11
CTG TAG ACC ACC ACC AGG AAG A	(hDEZoli2) ; SEQ ID Nr. 12
GCCAGGGTGACACGGAAG	(TIG2oli1) ; SEQ ID Nr. 13
GAGGCACCACGCAGCTC	(TIG2oli2) ; SEQ ID Nr. 14
CTCTCGAGAAAAGAGAGCTCACGGAAGCCCAGC	(COMoli1) ; SEQ ID Nr. 15
TTGTCGACTTAGAACTGTCCAGGGAAGTAGAAGC	(COMoli2) ; SEQ ID Nr. 16

-1/5-

Fig.1

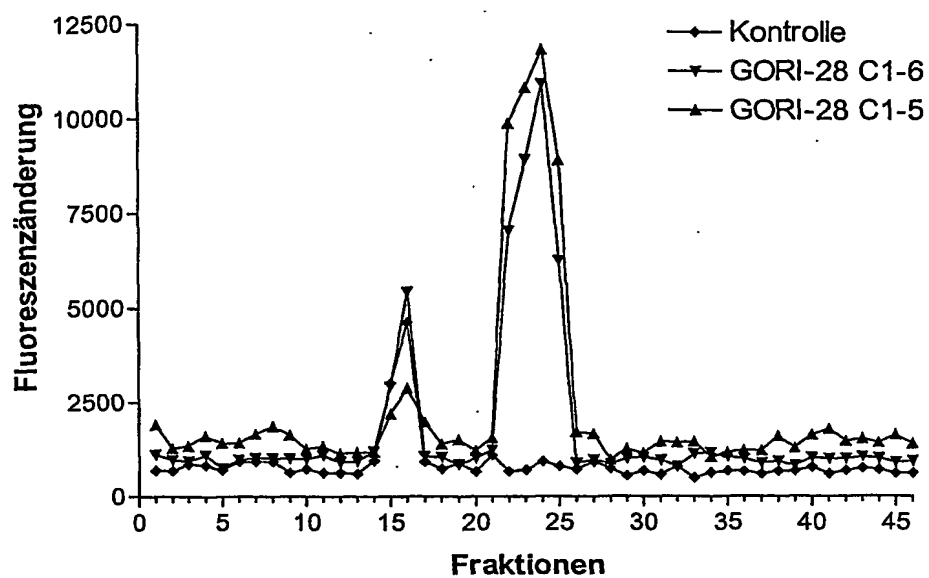
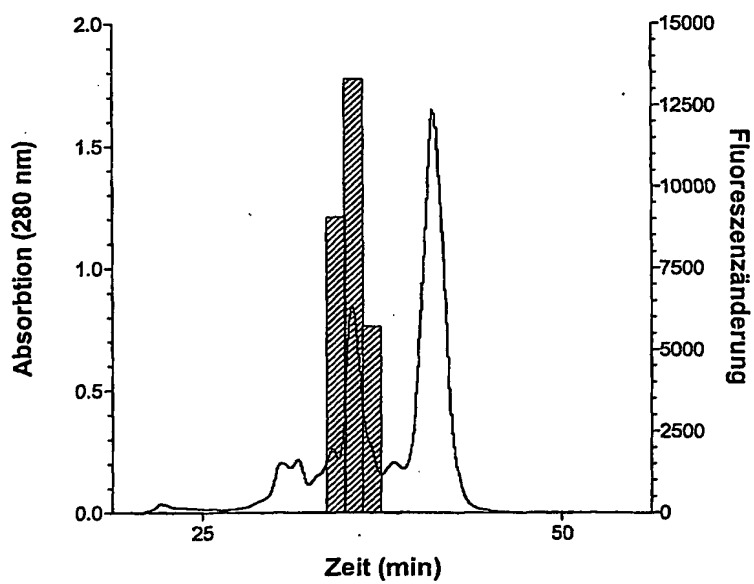


Fig.2



-2/5-

Fig.3

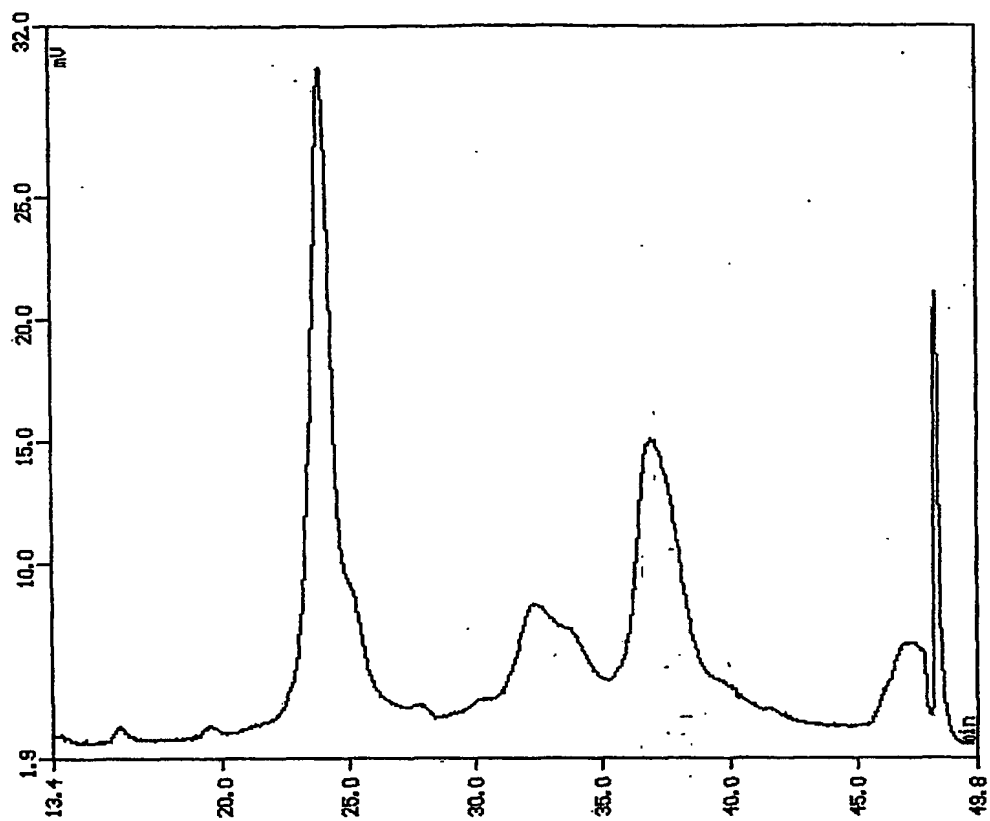
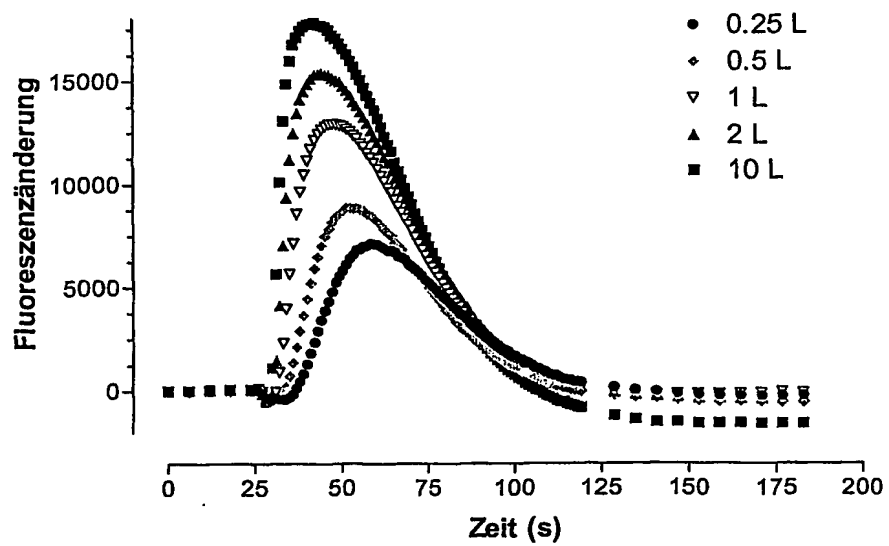


Fig.4



-3/5-

Fig.5

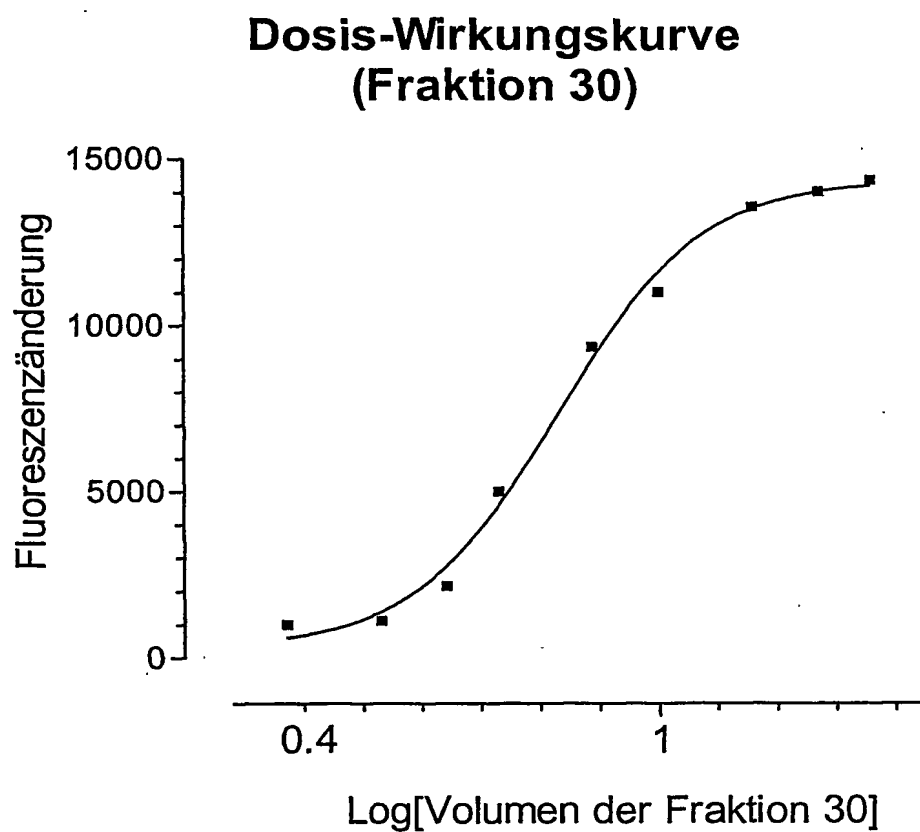
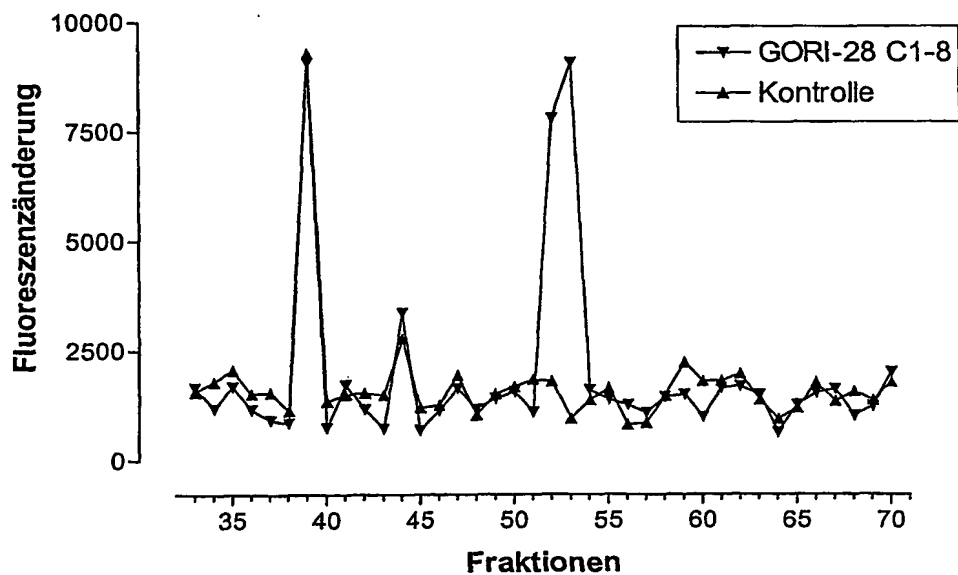


Fig.6



-4/5-

Fig.7

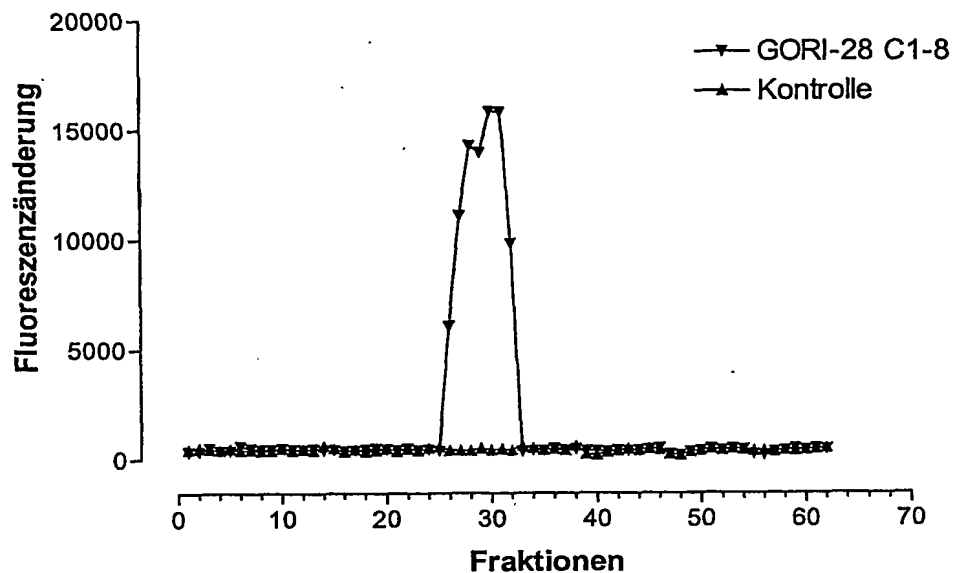
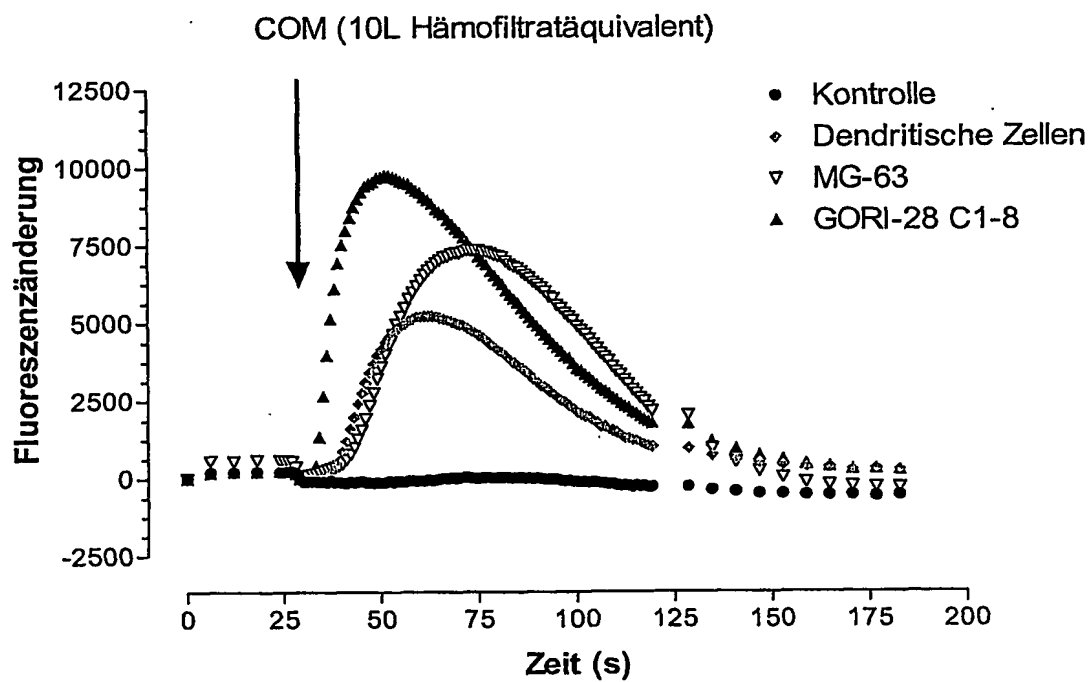
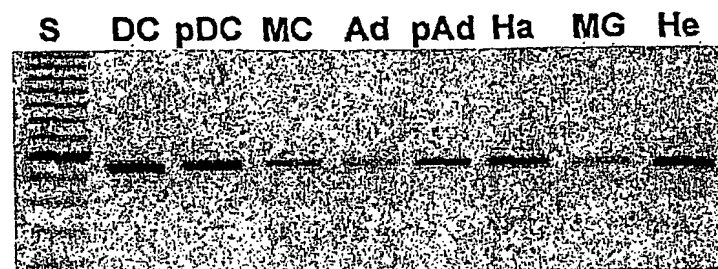
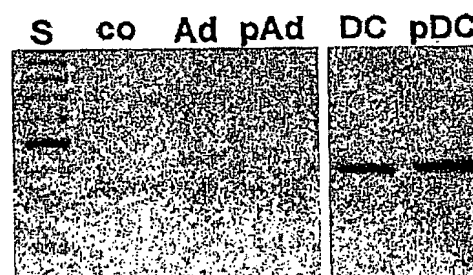
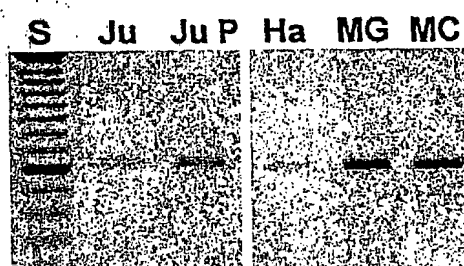
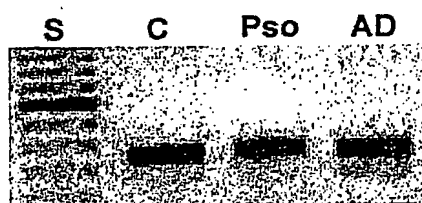
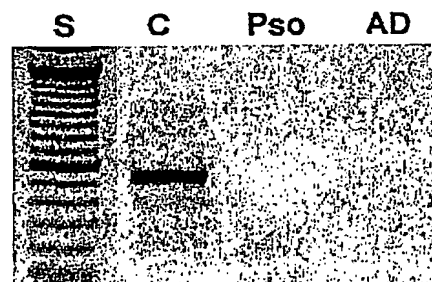


Fig.8



-5/5-

Fig.9**A RT-PCR Chondrosteomodulin****B RT-PCR GORI-28****Fig.10****A RT-PCR GORI-28****B RT-PCR Chondrosteomodulin**

BEST AVAILABLE COPY

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Mai 2004 (13.05.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2004/039978 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/12,
C07K 14/47, 16/18, G01N 33/50, 33/53, A61K 38/17,
A61P 3/04, 3/10, 5/18, 13/12, 17/00, 19/00, 29/00, 37/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/011799

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Oktober 2003 (24.10.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 51 205.1 31. Oktober 2002 (31.10.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): IPF PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE];
Feodor-Lynen-Str. 31, 30625 Hannover (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEDER, Wolfgang
[DE/DE]; IPF Pharmaceuticals GmbH, Feodor-Lynen-Str.
31, 30625 Hannover (DE). WENDLAND, Martin
[DE/DE]; IPF Pharmaceuticals GmbH, Feodor-Lynen-Str.
31, 30625 Hannover (DE). JOHN, Harald [DE/DE];

IPF Pharmaceuticals GMBH, Feodor-Lynen-Str. 31,
30625 Hannover (DE). RICHTER, Rudolf [DE/DE];
IPF Pharmaceuticals GMBH, Feodor-Lynen-Str. 31,
30625 Hannover (DE). MEYER, Markus [DE/DE]; IPF
Pharmaceuticals GMBH, Feodor-Lynen-Str. 31, 30625
Hannover (DE). FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE];
IPF Pharmaceuticals GMBH, Feodor-Lynen-Str. 31,
30625 Hannover (DE).

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Patentanwälte,
von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln
(DE).

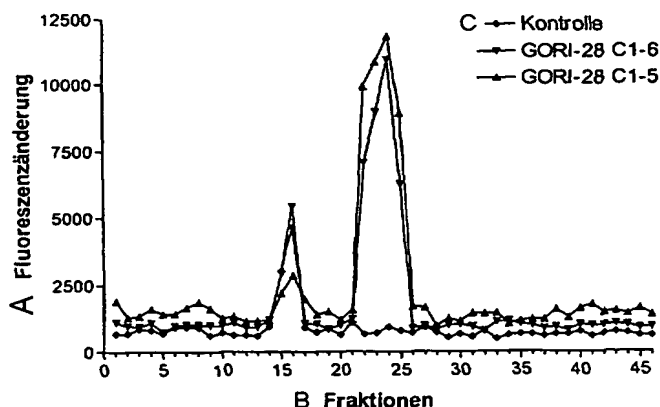
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HUMAN CHONDROOSTEOMODULIN (TIG2), PRODUCTION, AND USE FOR THE TREATMENT OR DIAGNOSIS OF BONE DISEASES, CARTILAGE DISEASES, OBESITY, INFLAMMATORY DISEASES, AND SKIN DISEASES

(54) Bezeichnung: HUMANES CHONDROOSTEOMODULIN (TIG2), HERSTELLUNG UND VERWENDUNG ZUR BEHANDLUNG ODER DIAGNOSE VON KNOCHEN- UND KNORPELERKRANKUNGEN, FETTSUCHT SOWIE ENTZÜNDLICHEN ERKRANKUNGEN UND HAUTERKRANKUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to the polypeptide COM and the derivatives thereof, methods for the production and isolation thereof from body liquids and tissues in a pure or partially purified form, and the use thereof as a medicament.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind das Polypeptid COM und seine Derivate, Verfahren zur Herstellung und Gewinnung in reiner oder partiell aufgereinigter Form aus Körperflüssigkeiten und Geweben, sowie seine Verwendung als Arzneimittel.

A... FLUORESCENCE MODIFICATION
B... FRACTIONS
C... CONTROL



eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

22. Juli 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: Application No
PC 03/11799

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/50 G01N33/53
A61K38/17 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/18 A61P13/12
A61P17/00 A61P19/00 A61P29/00 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K G01N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGPAL, S. ET AL.: "Tazarotene-induced Gene 2 (TIG2), a Novel Retinoid-Responsive Gene in Skin" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 109, no. 1, July 1997 (1997-07), pages 91-95, XP009018662 cited in the application	2,5-11
A	the whole document siehe insbesondere: page 93; figure 2 -/--	1,3,4,13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 March 2004

Date of mailing of the international search report

27. 05. 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuchs, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter

Application No

PC

03/11799

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	-& DATABASE EMBL, HEIDELBERG, BRD [Online] 30 May 2000 (2000-05-30), NAGPAL, S. ET AL.: "Retinoic acid receptor responder protein 2 precursor (Tazarotene-induced gene 2 protein) (RAR-responsive protein TIG2)" XP002273640 Database accession no. Q99969 Homo sapiens the whole document	2
A	----- ADAMS, A.E. ET AL.: "1,25 Dihydroxyvitamin D3 and Dexamethasone Induce the Cyclooxygenase 1 Gene in Osteoclast-Supporting Stromal Cells" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 74, no. 4, 15 September 1999 (1999-09-15), pages 587-595, XP002273638 cited in the application the whole document	1-11,13
A	----- SAMSON, M. ET AL.: "ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 28, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 1689-1700, XP001155279 cited in the application the whole document siehe insbesondere: page 1691; figure 1	1-11,13
A	----- METHNER, A. ET AL.: "A Novel G Protein-coupled Receptor with Homology to Neuropeptide and Chemoattractant Receptors Expressed during Bone Development" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 233, no. 2, 17 April 1997 (1997-04-17), pages 336-342, XP002204803 cited in the application the whole document siehe insbesondere: page 337; figure 1 ----- -/--	1-11,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inte Application No
 PU 03/11799

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHULZ-KNAPPE, P. ET AL.: "Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, vol. 776, no. 1, 25 July 1997 (1997-07-25), pages 125-132, XP004125547 the whole document -----	1-11,13
P,X	WO 03/006996 A (EUROSCREEN SA) 23 January 2003 (2003-01-23)	2-11
P,A	the whole document siehe insbesondere: page 11, line 12 - page 12, line 28 page 13, line 16 - page 14, line 19 page 54 - page 61; examples 2-11 page 82; figure 6 page 94 - page 98; figures 17,18 -----	1,13
P,X	WITTAMER, V. ET AL.: "Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin, a Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 198, no. 7, 6 October 2003 (2003-10-06), pages 977-985, XP002273639	2-11
P,A	the whole document siehe insbesondere: page 980, column 1, line 2 - column 2, line 8; figure 2C -----	1,13
T	MEDER, W. ET AL.: "Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23" FEBS LETTERS, vol. 555, no. 3, 18 December 2003 (2003-12-18), pages 495-499, XP004481038 the whole document -----	1-11,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/11799

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-11 (all parts)- 13 (partly)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box II.4

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: 1-11 (all entirely), 13 (in part)

COM having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, method for producing COM, use of COM for producing a medicament or a diagnostic agent, medicament containing COM, COM and its receptor GORI-28 as ligand-receptor system, use of the ligand-receptor system for screening substances, primer COMoli1 and COMoli2;

2. Claim: 13 (in part)

primer TIG2oli1 and TIG2oli2;

3. Claim: 13 (in part)

primer GORI28oli1 and GORI28oli2;

4. Claim: 13 (in part)

primer mDEZoli1, mDEZoli2, mDEZoli3 and mDEZoli4;

5. Claim: 15 (in part)

primer hDEZ_a_oli5, hDEZ_a_oli4, hDEZoli3 and hDEZoli2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter

Application No

PC

03/11799

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03006996	A	23-01-2003	US 2003096299 A1	22-05-2003
			CA 2450587 A1	23-01-2003
			WO 03006996 A2	23-01-2003
			EP 1405083 A2	07-04-2004
			US 2003104478 A1	05-06-2003
			US 2004086966 A1	06-05-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1

03/11799

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7	C12N15/12	C07K14/47	C07K16/18	G01N33/50	G01N33/53
	A61K38/17	A61P3/04	A61P3/10	A61P5/18	A61P13/12
	A61P17/00	A61P19/00	A61P29/00	A61P37/00	

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K G01N A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAGPAL, S. ET AL.: "Tazarotene-induced Gene 2 (TIG2), a Novel Retinoid-Responsive Gene in Skin" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, Bd. 109, Nr. 1, Juli 1997 (1997-07), Seiten 91-95, XP009018662 in der Anmeldung erwähnt	2,5-11
A	das ganze Dokument siehe insbesondere: Seite 93; Abbildung 2 -/--	1,3,4,13



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. März 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27. 05. 2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuchs, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	-& DATABASE EMBL, HEIDELBERG, BRD [Online] 30. Mai 2000 (2000-05-30), NAGPAL, S. ET AL.: "Retinoic acid receptor responder protein 2 precursor (Tazarotene-induced gene 2 protein) (RAR-responsive protein TIG2)" XP002273640 Database accession no. Q99969 Homo sapiens das ganze Dokument	2
A	----- ADAMS, A.E. ET AL.: "1,25 Dihydroxyvitamin D3 and Dexamethasone Induce the Cyclooxygenase 1 Gene in Osteoclast-Supporting Stromal Cells" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, Bd. 74, Nr. 4, 15. September 1999 (1999-09-15), Seiten 587-595, XP002273638 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11,13
A	----- SAMSON, M. ET AL.: "ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 28, Nr. 5, Mai 1998 (1998-05), Seiten 1689-1700, XP001155279 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument siehe insbesondere: Seite 1691; Abbildung 1	1-11,13
A	----- METHNER, A. ET AL.: "A Novel G Protein-coupled Receptor with Homology to Neuropeptide and Chemoattractant Receptors Expressed during Bone Development" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 233, Nr. 2, 17. April 1997 (1997-04-17), Seiten 336-342, XP002204803 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument siehe insbesondere: Seite 337; Abbildung 1 -----	1-11,13
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SCHULZ-KNAPPE, P. ET AL.: "Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, Bd. 776, Nr. 1, 25. Juli 1997 (1997-07-25), Seiten 125-132, XP004125547 das ganze Dokument -----	1-11,13
P,X	WO 03/006996 A (EUROSCREEN SA) 23. Januar 2003 (2003-01-23)	2-11
P,A	das ganze Dokument siehe insbesondere: Seite 11, Zeile 12 - Seite 12, Zeile 28 Seite 13, Zeile 16 - Seite 14, Zeile 19 Seite 54 - Seite 61; Beispiele 2-11 Seite 82; Abbildung 6 Seite 94 - Seite 98; Abbildungen 17,18 -----	1,13
P,X	WITTAMER, V. ET AL.: "Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin, a Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd. 198, Nr. 7, 6. Oktober 2003 (2003-10-06), Seiten 977-985, XP002273639	2-11
P,A	das ganze Dokument siehe insbesondere: Seite 980, Spalte 1, Zeile 2 - Spalte 2, Zeile 8; Abbildung 2C -----	1,13
T	MEDER, W. ET AL.: "Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23" FEBS LETTERS, Bd. 555, Nr. 3, 18. Dezember 2003 (2003-12-18), Seiten 495-499, XP004481038 das ganze Dokument -----	1-11,13

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-11 (alle vollständig), 13 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-11 (alle vollständig), 13 (teilweise)

COM mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 1, Verfahren zur Herstellung von COM, Verwendung von COM zur Herstellung eines Arzneimittels oder eines Diagnostikmittels, Arzneimittel enthaltend COM, COM und dessen Rezeptor GORI-28 als Ligand-Rezeptor-System, Verwendung des Ligand-Rezeptor-Systems zum Screening von Substanzen, Primer COMoli1 und COMoli2;

2. Anspruch: 13 (teilweise)

Primer TIG2oli1 und TIG2oli2;

3. Anspruch: 13 (teilweise)

Primer GORI28oli1 und GORI28oli2;

4. Anspruch: 13 (teilweise)

Primer mDEZoli1, mDEZoli2, mDEZoli3 und mDEZoli4;

5. Anspruch: 13 (teilweise)

Primer hDEZ_a_0li5, hDEZ_a_0li4, hDEZoli3 und hDEZoli2.

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC1 03/11799

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03006996 A	23-01-2003	US 2003096299 A1	22-05-2003
		CA 2450587 A1	23-01-2003
		WO 03006996 A2	23-01-2003
		EP 1405083 A2	07-04-2004
		US 2003104478 A1	05-06-2003
		US 2004086966 A1	06-05-2004

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☒ OTHER:

Punch Holes

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.